

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 517 326

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 22479

(54) Production d'une préparation de pullulane à répartition étroite de masses moléculaires.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 19/10; A 61 K 31/715.

(22) Date de dépôt 1^{er} décembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 22 du 3-6-1983.

(71) Déposant : Société dite : KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KEN-
KYUJO. — JP.

(72) Invention de : Mikihiko Yoshida.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne une préparation de pullulane formé de polymères à répartition étroite des masses molaires ; ces préparations sont utilisables notamment comme agent de dilution du plasma sanguin.

5 Le pullulane est un glucane obtenu par culture de microorganismes d'*Aureobasidium pullulans* dans un milieu contenant des saccharides tels que mono- et/ou oligo-saccharides, en culture noyée ; il est pratiquement constitué d'unités de maltotriose polymérisées linéairement
10 par des liaisons α -1,6-glucosidiques.

On a obtenu à l'échelle industrielle des pullulanes de masses moléculaires variant de 80 000 à 300 000, utilisables dans différents domaines, comme les industries chimique et alimentaire, où certaines propriétés supérieures des pullulanes, telles que solubilité dans l'eau, comestibilité,
15 adhésivité et aptitude à former facilement des pellicules, sont employées avantageusement. Le domaine d'utilisation du pullulane peut être élargi grâce aux études de la demande sur la répartition des masses moléculaires des pullulanes du commerce, présentant différentes moyennes pondé-
20 rales de masses moléculaires (désigné ci-après par \bar{M}_w). Par filtration sur gel, la demanderesse a déterminé les rapports \bar{M}_w/\bar{M}_n , \bar{M}_n étant la moyenne des masses molaires en nombre. Ces études confirment que tous les pullulanes du
25 commerce essayés ont une répartition de masses moléculaires relativement large, supérieure à 2.

L'invention est basée sur les constatations imprévues suivantes : lors de l'hydrolyse partielle d'un pullulane, plus la masse moléculaire d'une fraction de pullulane est élevée, plus cette fraction est susceptible d'être hydrolysée ; et l'on peut obtenir la composition de pullulane cherchée, c'est-à-dire un mélange à répartition étroite de masses moléculaires, en particulier un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépassant pas 1,5, avec un rendement supérieur,
35 par fractionnement d'un produit d'hydrolyse partielle de

2

pullulane, à l'aide d'un précipitant tel qu'un solvant organique.

Le nouveau procédé de production de compositions de pullulane à répartition moléculaire étroite, consiste
5 à hydrolyser partiellement un pullulane, à fractionner le produit résultant, et à recueillir la fraction dont le rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépasse pas 1,5.

Convient comme pullulane de départ, conformément à l'invention, toute préparation de pullulane dont
10 l'hydrolyse partielle permet d'obtenir la composition cherchée, ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n n'excédant pas 1,5 : on utilise habituellement un pullulane de \bar{M}_w supérieur à celui de la composition de pullulane cherchée.

Les conditions d'hydrolyse partielle sont celles
15 qui permettent cette hydrolyse partielle du pullulane et augmentent le rendement en préparation de pullulane cherchée : par exemple, on peut réaliser l'hydrolyse par traitement d'une solution aqueuse de pullulane avec un acide, organique ou minéral, comme acide lactique, ci-
20 trique, chlorhydrique ou sulfurique ; avec une enzyme comme cyclodextrine glucanotransférase (EC 2.4.1.19), α -amylase (EC 3.2.1.1.), pullulanase (EC 3.2.1.41), isopullulanase (EC 3.2.1.57) ou isoamylase (EC 3.2.1.68) ; ou par l'action d'ultrasons. Pour la production à l'échelle indus-
25 trielle, les modes opératoires préférés sont ceux qui impliquent l'utilisation d'un acide ou d'une enzyme.

La séparation de la fraction de pullulane cherchée, à partir du produit d'hydrolyse partielle, peut être réalisée habituellement par une précipitation fractionnée
30 au moyen d'un solvant organique hydrosoluble, comme méthanol, éthanol, isopropanol ou acétone, ou par dissolution fractionnée, éventuellement en combinaison avec d'autres modes opératoires, tels que filtration sur gel et/ou séparation par une membrane filtrante.

35 La fraction de pullulane, ainsi obtenue, peut

être habituellement purifiée par décoloration sur du charbon activé, et/ou désionisation par échangeur d'ions. On peut facilement obtenir, par filtration sur membrane, et concentration, un sirop incolore, transparent; par filtration sur membrane, concentration, séchage et, éventuellement réduction en poudre, on peut produire une poudre blanche de pullulane apyrogène.

Comme la préparation de pullulane obtenue est constituée de chaînes polymères linéaires, solubles dans l'eau, hautement purifiées, avec un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépassant pas 1,5, on peut l'utiliser avantageusement comme un authentique polymère hydrosoluble : par exemple, pour la filtration sur gel ou la chromatographie en phase liquide, il est préférable d'utiliser une préparation de pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,1 à 1,3. A ces fins, il peut être commode de disposer d'une série de polymères hydrosolubles, étalonnés, contenant différentes préparations de pullulans de \bar{M}_w connus, par exemple 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 ou 80 000.

La préparation de pullulane, obtenue conformément à l'invention, trouve différentes utilisations en tant que diluant du plasma et comme hyperkinémique ; ces produits peuvent être préparés par dissolution d'une préparation de pullulane, dotée d'un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépassant pas 1,5, ($\bar{M}_w = 30\ 000-90\ 000$), afin d'obtenir une solution aqueuse de pullulane de concentration de l'ordre de 4 à 10% en poids/volume, de produit solide, avec addition d'agent isotonique tel que produit minéral et/ou saccharide, suivie de stérilisation de la solution résultante de pullulane isotonique.

Les expérimentations suivantes, qui expliquent la présente invention plus en détail, permettent de la mieux comprendre.

EXPERIMENTATION 1

Préparation d'un pullulane à répartition étroite de masse moléculaire.

Trois portions aliquotes d'une solution aqueuse de pullu-
5 lane à 10% en poids/volume, présentant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 2,5 ($\bar{M}_w = 150\ 000$), sont traitées comme suit.

Une portion A est soumise au traitement ultérieur sans hydrolyse préalable.

Une portion B est acidifiée à un pH voisin de 2 avec de
10 l'acide sulfurique, puis elle est abandonnée pendant 2 heures à cette valeur de pH et à 80°C, pour que s'effectue l'hydrolyse partielle, après quoi, on neutralise rapidement la solution,

A la portion restante C on ajoute une α -amylase du commerce, la "Neospitase" de Nagase & Company, Ltd, à raison
15 de 550 unités dextrinogènes/gramme de pullulane, et on laisse incuber ce mélange à pH 5,5 et à 60°C pendant 20 heures, pour que s'effectue l'hydrolyse enzymatique, puis l'on chauffe pour inactiver l'activité enzymatique rési-
20 due.

Tout en maintenant à 30°C, les trois portions A, B et C, on leur ajoute du méthanol, de façon à obtenir pour chacune une concentration de 43% en volume/volume ; après élimination des couches inférieures, résultantes, on ajoute
25 te aux couches supérieures du méthanol, pour établir, dans chaque cas, une concentration de 60% en volume/volume. Après repos, les couches inférieures, nouvellement formées, sont recueillies, et réduites en poudre, ce qui donne des préparations de pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,4
30 ($\bar{M}_w = 60\ 000$).

Les rendements, rapportés au pullulane de départ, sont indiqués dans le tableau 1.

(voir le tableau 1 à la page suivante).

5

TABLEAU 1

5	Traitement	Pas d'hydrolyse	Hydrolyse	
			Acide	Enzyme
	Rendement (%)	16	48	55
5	Il ressort des résultats indiqués dans ce tableau que l'on peut obtenir une plus grande quantité de pullulane recherché, conformément à l'invention, lorsqu'on utilise un hydrolysate partiel plutôt que du pullulane intact.			
10	Afin de connaître la raison de ces résultats, on a effectué une étude par filtration, sur gel, de la répartition des masses moléculaires ; elle a porté sur des petits échantillons, recueillis au cours de l'hydrolyse partielle, à certains intervalles de temps. Cette étude confirme que			
15	plus la masse moléculaire d'une fraction de pullulane est élevée, plus cette fraction est susceptible d'être hydrolysée partiellement à l'aide d'un acide ou d'une enzyme ; ainsi, un choix approprié des conditions d'hydrolyse aboutit à un rendement maximal en pullulane voulu, selon			
20	l'invention, allant jusqu'à 40 à 60%. Il se confirme également que l'hydrolyse partielle, enzymatique, donne un rendement relativement supérieur à celui qu'on obtient par hydrolyse partielle, acide.			

EXPERIMENTATION 2

25 Injection intraveineuse de pullulanes de différents rapports \bar{M}_w/\bar{M}_n .

On prépare 4 solutions de produit de dilution du plasma, pour des essais d'injection intraveineuse, par dissolution de fractions de préparations de pullulane ayant des rapports \bar{M}_w/\bar{M}_n de 2,8, 2, 1,5 et 1,2 ($\bar{M}_w = 60\ 000$), dans du sérum physiologique, de façon à obtenir une concentration de 6% en poids/volume, puis on stérilise les solutions résultantes.

Ces produits de dilution du plasma sont rapidement injectés à des lapins de 3 kg environ, à raison de 100 ml/kg,

en environ 15 minutes, puis on examine la pression veineuse et l'excrétion urinaire ; les pressions veineuses (mm H₂O) sont mesurées avant et après l'injection, et l'on divise la pression après l'injection par la pression avant l'injection, ce qui donne les facteurs utilisés comme critère pour la détermination de l'effort du système circulatoire ; on dose les quantités de pullulane excrété dans les urines à des intervalles de 2 heures suivant l'injection ; les taux d'excrétion %, exprimant le rapport de la quantité de pullulane excrété à celle de pullulane injecté, sont utilisés comme critères pour la détermination du pullulane en circulation et de son effet de diluant du plasma.

Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau 2, dans lequel toutes les valeurs sont des moyennes obtenues sur 2 lapins.

TABLEAU 2

\bar{M}_w/\bar{M}_n	2,8	2,0	1,5	1,2
Pression veineuse	2,1	1,7	1,3	1,2
(facteur d'augmentation)				
Taux d'excrétion (%)	45	32	17	13
Pesée	(-)*	(+)*	(+)**	(+)**

Note : Pesée : (+) supérieur, (+) normal, et (-) inférieur
*), témoin ; et **), présente invention.

Il ressort des résultats indiqués dans ce tableau que l'utilisation d'un pullulane, dont le rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépasse pas 1,5, aboutit à une légère augmentation de la pression veineuse, et ne donne pas d'excrétion urinaire rapide du pullulane injecté ; c'est pourquoi ce pullulane convient parfaitement comme produit pour la dilution du plasma.

On fractionne en 2 échantillons, par filtration sur gel, un pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 2,8 ($\bar{M}_w = 60\ 000$) ; l'un des échantillons a une masse moléculaire moyenne ne dépassant pas 15 000, et l'autre supérieure à

150 000 ; on les injecte séparément à des lapins, comme décrit plus haut. On constate que l'injection du premier échantillon entraîne une augmentation de la pression veineuse qui est multipliée par environ 1,2, l'excrétion urinaire s'élevant jusqu'à 80% ; par contre l'injection de l'autre échantillon aboutit à une excrétion urinaire de l'ordre de 7%, mais avec une augmentation de la pression veineuse qui est multipliée par 3 environ.

Ces résultats conduisent aux conclusions suivantes : lorsque la masse moléculaire moyenne d'un pullulane ne dépasse pas 15 000, un demi temps nécessaire à partir de l'injection pour l'excrétion urinaire, est très court, n'aboutissant qu'à un effort supérieur du rein, aussi n'en peut-on espérer aucun effet de dilution du plasma ; d'autre part, l'utilisation d'un pullulane de masse moléculaire moyenne supérieure à 150 000 constitue un danger de voir une augmentation relative de la pression veineuse lors d'une injection intraveineuse rapide, ce qui entraînerait un fort accroissement de l'effort du système circulatoire.

En conséquence, un pullulane utilisable comme diluant du plasma doit avoir une répartition étroite de masse moléculaire, le rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n ne dépassant pas 1,5, obtenu à la fois par une diminution aussi forte que possible de l'échantillon de poids moléculaire inférieur ($< 15\ 000$), et de l'échantillon de poids moléculaire supérieur ($> 150\ 000$), amenant la masse moléculaire dans l'intervalle de 30 000 à 90 000, comme il a été suggéré dans la demande de brevet japonais n° 63976/79.

Plusieurs formes de réalisation non limitatives de l'invention sont décrites ci-après.

EXEMPLE 1

Une solution aqueuse de pullulane à 10% en poids/volume, préparée par dissolution de 200 g de pullulane de rapport $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,3$ ($\bar{M}_w = 300\ 000$) dans l'eau, est acidifiée à un pH voisin de 2 avec de l'acide chlorhydrique, et mis à

incuber à 80°C pendant 2 heures, en vue d'une hydrolyse partielle ; elle est neutralisée ensuite avec de l'hydroxyde de sodium.

Cette solution de produit d'hydrolyse partielle du pullu-
5 lane est alors refroidie à 30°C, et additionnée de méthanol à cette même température, de façon à obtenir une concentration de 40% en volume/volume. Après élimination de la couche inférieure qui s'est formée, on ajoute à la couche supérieure, restante, du méthanol, pour obtenir une
10 concentration de 55% en volume/volume, et on laisse reposer le mélange avant de recueillir la couche inférieure nouvellement formée.

On chasse alors par distillation le méthanol de cette couche inférieure, et la solution aqueuse résiduelle de
15 pullulane est purifiée par décoloration sur du carbone actif, désionisation au moyen d'échangeurs d'ions de forme H et OH, et filtration par membrane. Le produit résultant est concentré, séché, et réduit en poudre, ce qui donne environ 90 grammes de poudre blanche de pullulane ayant un
20 rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,4 ($\bar{M}_w = 50\ 000$).

EXEMPLE 2

Une solution aqueuse de pullulane à 20% en poids/volume, obtenu par dissolution de 200 g de pullulane de rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 2,6 ($\bar{M}_w = 80\ 000$) dans de l'eau, est acidifiée
25 à un pH proche de 2 avec de l'acide sulfurique et soumise à une hydrolyse partielle à 80°C pendant 2 heures : on neutralise avec de la soude la solution résultante de produit d'hydrolyse partielle du pullulane.

On ajoute ensuite à cette solution de l'éthanol, pour obtenir une concentration de 50% en volume/volume tout en maintenant à 40°C, et, après élimination de la couche inférieure qui se sépare, on additionne à nouveau la couche supérieure résiduelle avec de l'éthanol, de façon à arriver à une concentration de 70% en volume/volume, puis on
35 recueille la couche inférieure nouvellement formée. Cette

couche inférieure est purifiée comme dans l'exemple 1, et donne environ 70 grammes d'une poudre blanche de pullulane présentant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,3 ($\bar{M}_w = 30\ 000$).

EXEMPLE 3

- 5 Par dissolution de 200 g de pullulane de $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,3$ ($\bar{M}_w = 200\ 000$) dans l'eau, on prépare une solution aqueuse de pullulane à 5% en poids/volume, que l'on hydrolyse partiellement comme dans l'exemple 1, puis on neutralise. On ajoute de l'acétone à cette solution de produit d'hydro-
- 10 lyse partielle de pullulane, de façon à avoir une concentration de 20% en volume/volume ; après élimination de la couche inférieure résultante, la couche supérieure, restante, est à nouveau additionnée d'acétone de façon à obtenir une concentration de 45% en volume/volume. On recueille
- 15 la couche inférieure, nouvellement formée, et on la purifie comme dans l'exemple 1, ce qui donne environ 80 g d'une poudre blanche de pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,5 ($\bar{M}_w = 85\ 000$).

EXEMPLE 4

- 20 A une solution aqueuse de pullulane à 10% en poids/volume, préparée par dissolution de 200 g de pullulane de $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,3$ ($\bar{M}_w = 300\ 000$) dans l'eau, est ajoutée une cyclodextrine glucanotransférase (EC 2.4.1.19) comme décrit dans la publication de la demande de brevet japonaise n°27791/78,
- 25 à raison de 150 unités dextrinogènes par gramme de pullulane ; ce mélange est soumis à une hydrolyse enzymatique à 65°C et pH 6 pendant 20 heures. La réaction enzymatique est alors arrêtée par chauffage à 90°C pendant 15 minutes. La solution résultante de produit d'hydrolyse partielle
- 30 est fractionnée avec du méthanol, et la fraction voulue est purifiée, concentrée et réduite en poudre comme dans l'exemple 1, ce qui donne environ 105 g de poudre blanche de pullulane, ayant le même rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n et le même \bar{M}_w que dans l'exemple 1.

EXEMPLE 5

Une solution aqueuse à 20% en poids/volume de pullulane, préparée par dissolution de 200 g de pullulane de $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,6$ ($\bar{M}_w = 80\ 000$) dans l'eau, est additionnée de la pul-
5 lulanase du commerce (EC 3.2.1.41), de Hayashibara Bio-chemical Laboratories Inc., à raison de 4 unités par gramme de pullulane, et ce mélange est soumis à une hydrolyse enzymatique à pH 6, à 50°C, pendant 30 heures. Après arrêt de la réaction enzymatique par chauffage, la
10 solution du produit d'hydrolyse partielle de pullulane est fractionnée avec de l'éthanol, et la fraction cherchée est purifiée, concentrée et réduite en poudre, comme dans l'exemple 2, ce qui donne 80 g environ de poudre blanche de pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,1 ($\bar{M}_w = 20\ 000$).

EXEMPLE 6

On prépare une solution aqueuse de pullulane à 5% en poids/volume, par dissolution dans de l'eau 200 g de pullulane de $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,1$ ($\bar{M}_w = 200\ 000$), et on ajoute 500 unités dextrinogène de Neospitase par gramme de pullulane ; on
20 laisse incuber ce mélange à pH 6,4, à 55°C, pendant 24 heures, pour que s'effectue l'hydrolyse enzymatique. Après arrêt de l'hydrolyse par chauffage, la solution de produit d'hydrolyse partielle du pullulane obtenue est fractionnée avec de l'acétone, et la fraction cherchée
25 est purifiée, concentrée et réduite en poudre, comme dans l'exemple 3, ce qui donne 110 g environ de poudre blanche de pullulane de même rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n et le même \bar{M}_w que dans l'exemple 3.

EXEMPLE 7

30 Préparée par dissolution dans l'eau de 200 g de pullulane ayant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 2,3 ($\bar{M}_w = 200\ 000$), une solution aqueuse à 10% en poids/volume de pullulane est additionnée de l'isoamylase du commerce (EC 3.2.1.68) de Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., à raison de 200 unités dex-
35 trinogènes/g de pullulane, et on laisse incuber ce mélange

- à pH 4,3, à 50°C, pendant 20 heures, pour que s'effectue une hydrolyse enzymatique partielle. Après arrêt de l'hydrolyse par chauffage, la solution résultante de produit d'hydrolyse partielle du pullulane est fractionnée
- 5 avec du méthanol, et la fraction cherchée est purifiée, concentrée et réduite en poudre comme dans l'exemple 1, ce qui donne environ 90 g de poudre blanche de pullulane présentant un rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n de 1,2 ($\bar{M}_w = 40\ 000$).

EXEMPLE 8

- 10 Une solution aqueuse de pullulane à 10% en poids/volume, préparée par dissolution de 200 g de pullulane de $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2,1$ ($\bar{M}_w = 580\ 000$), dans une solution de NaCl à 0,05 M, est traitée avec un appareil à ultrasons "Branson Ultrasonic Cleaner Model 12 " de Yamato Scientific Co, Ltd.,
- 15 pendant 30 minutes à 45 KHz, puissance de sortie 50 W, afin de réaliser l'hydrolyse partielle du pullulane. La solution résultante de produit d'hydrolyse partielle du pullulane est fractionnée avec du méthanol, et la fraction cherchée est purifiée, concentrée et réduite en pou-
- 20 dre, comme dans l'exemple 1, ce qui donne environ 70 g de poudre blanche de pullulane ayant le même rapport \bar{M}_w/\bar{M}_n et le même \bar{M}_w que dans l'exemple 1.

Revendications

1. Procédé de production d'une préparation de pullulane à répartition étroite de masses moléculaires, caractérisé en ce qu'on effectue une hydrolyse partielle d'un pullulane, on soumet à un fractionnement le produit résultant, et l'on recueille la fraction de pullulane ayant un rapport $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ne dépassant pas 1,5.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydrolyse partielle du pullulane est réalisée à l'aide d'un acide, en particulier acide lactique, citrique, chlorhydrique ou sulfurique.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydrolyse partielle du pullulane est réalisée sous l'action d'une enzyme, notamment cyclodextrine glucanotransférase, α -amylase, pullulanase, isopullulanase ou isoamylase.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydrolyse partielle du pullulane est réalisée au moyen d'un appareil à ultra-sons.
5. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le fractionnement est réalisé au moyen d'une précipitation fractionnée, à l'aide d'un solvant organique, en particulier méthanol, éthanol, isopropanol ou acétone.
6. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le fractionnement est réalisé par dissolution fractionnée.
7. Nouvelle composition de pullulane, caractérisée en ce qu'elle est formée par des polymères à répartition étroite de masses moléculaires, le rapport $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ne dépassant pas 1,5.
8. Application de la composition suivant la revendication 7 en tant qu'agent de dilution du plasma sanguin, ou d'agent hyperkinémique.

13

9. Application suivant la revendication 8, caractérisée en ce que le \bar{M}_w de la préparation de pullulane est compris dans l'intervalle de 30 000 à 90 000.